

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# Translation

Japanese Laid-Open Patent Application Publication (Kokai)  
H6-16698

## CLAIMS:

A method for separation and purification of a polyclonal antibody, wherein an antigen-specific antibody is separated from a polyclonal antibody that contains an antigen-nonspecific antibody by utilizing column chromatography with a hydroxyapatite as a carrier.

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-16698

(43)公開日 平成6年(1994)1月25日

(51)Int.Cl.

C07K 15/14  
3/20

識別記号

庁内整理番号

8517-4H

8517-4H

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全7頁)

(21)出願番号 特願平3-233722

(22)出願日 平成3年(1991)8月22日

(71)出願人 000003034

東亜合成化学工業株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72)発明者 佐々木 實

愛知県名古屋市中区瑞穂区瑞穂町川澄名古屋

立大学医学部内

(72)発明者 国松 巳成

愛知県名古屋市中区瑞穂区瑞穂町川澄名古屋

立大学医学部内

(72)発明者 加藤 ゆかり

愛知県名古屋市中区船見町1番地の1東亜

合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリクローナル抗体の分離精製方法

(57)【要約】

【目的】 抗原特異抗体以外に抗原非特異抗体を含むポリクローナル抗体から、抗原特異抗体にとって穏和な条件下でかつ簡便に、抗原特異抗体を分離精製する方法を提供する。

【構成】 ヒドロキシアパタイトを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いて、抗原非特異抗体を含有するポリクローナル抗体から抗原特異抗体を分離精製することを特徴とするポリクローナル抗体の分離精製方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒドロキシアパタイトを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いて、抗原非特異抗体を含有するポリクローナル抗体から抗原特異抗体を分離精製することを特徴とするポリクローナル抗体の分離精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ある抗原に特異的に反応する抗体（本明細書において抗原特異抗体という。）および該抗原と特異的には反応しない抗体（本明細書において抗原非特異抗体という。）を含有するポリクローナル抗体から、抗原特異抗体を穏和な条件下で簡便に分離精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 モノクローナル抗体は、単一の抗体結合部位を有する抗原特異抗体であり、免疫学の研究手段、臨床診断、治療および物質の精製等に有用である。モノクローナル抗体を得る手段として、ケーラーとミルスタインにより開発された作製方法があり〔ネイチャー、256巻、495-497ページ（1975年）、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー、6巻、511-519ページ（1976年）〕、この方法により得られるモノクローナル抗体は、抗原特異性のみならず、クラス、サブクラスおよび抗原に対する結合能力等において均一であるという優れた長を有する。しかし、この方法によりモノクローナル抗体を作製するためには、種々の煩瑣な工程が必要であり、特に抗原特異抗体の産生細胞をスクリーニングするのに時間を要し、また細胞培養専用の設備等を使用するために高い経費を必要とするという問題がある。

【0003】 臨床検査或いは免疫学の研究手段に応用し得る程度に、抗原特異抗体を精製する簡便な方法として、数種類の吸着操作を施し、ポリクローナル抗体を分離精製する方法がある。このような分離精製法として、例えばプロテインG、プロテインAまたは抗原などをセファロースに結合させたアフィニティゲルなどを用いる方法がある。しかし、アフィニティゲルを用いた抗原特異抗体の分離精製法は、吸着した抗原特異抗体をゲルから溶出させる際に、抗原特異抗体にとって過剰な酸またはアルカリ性液体を溶離液として使用する必要があるため、分離精製後、抗原特異抗体の活性が低下することがあり、また費用も高いという問題がある。

【0004】 最近、穏和な条件下で簡便に抗体を分離する方法として、ヒドロキシアパタイトを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いる方法が試みられている。例えば、特開昭63-146896号公報において、各種クラスまたはサブクラスに分類されるモノクローナル抗体、およびマウス、ヒト、ウサギ等の血清免疫グロブリン（いずれも1gG、コーンの分画2）を分離した例が示されている。一般に、抗原特異性および型（クラス、

サブクラス）は、互いに全く独立した抗体の特性であり、抗体を抗原特異性により分離することができる可能性と、抗体を型により分離することができる可能性とは全く相関がない。上記公開特許公報に記載された抗体の分離例は、クラスまたはサブクラスにより抗体を分離することができる可能性について検討したものであり、ヒドロキシアパタイトを担体とするカラムクロマトグラフィーにより、ポリクローナル抗体中に本来含有される抗原特異抗体と、不純物として含有される抗原非特異抗体とを分離することができることを示した例は今までに見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、抗原特異抗体以外に抗原非特異抗体を含むポリクローナル抗体から、抗原特異抗体にとって穏和な条件下でかつ簡便に、抗原特異抗体を分離精製する方法を提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記問題を解決するため鋭意検討した結果、ヒドロキシアパタイトを担体としたカラムクロマトグラフィーは、ポリクローナル抗体から抗原特異抗体を分離するのに有効な手段であることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明はヒドロキシアパタイトを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いて、抗原非特異抗体を含有するポリクローナル抗体から抗原特異抗体を分離精製することを特徴とするポリクローナル抗体の分離精製方法である。

【0007】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明における分離精製の対象は抗原非特異抗体を含有するポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、動物をある抗原（A）で免疫した抗血清からイムノグロブリンとして得られるものである。従って、ポリクローナル抗体中には、抗原（A）と特異的に反応する抗体（A）が抗原特異抗体として常に含有される。一方、動物を抗原（A）で免疫する以前に、動物体内における免疫応答により抗体（X）が産生されており、又動物を抗原（A）で免疫する際、多くの場合抗原（A）と共に、他の種類の抗原（B）も不純物として動物体内へ混入するため、抗原（B）とは特異的に反応するが、抗原（A）と特異的に反応しない抗体（B）も産生される。本発明において分離精製の対象とされるポリクローナル抗体には、これら抗体（X）または抗体（B）が抗原非特異抗体として含有される。

【0008】 本発明において分離精製の対象とするポリクローナル抗体を得るための動物、およびその動物を免疫するために使用する抗原（A）には、全く制限がなく、動物としては、例えば牛、馬、羊、兎および鼠等があり、抗原（A）としては、例えば、牛血清アルブミン、牛ガンマグロブリン、卵アルブミン、ヒザラガイヘ

モシアニン、卵白リゾチームおよび精製ツベルクリン蛋白等の蛋白抗原；デキストラン、フィコールおよびリボ多糖の多糖類抗原；羊赤血球、リンパ球および腫瘍細胞等の細胞性抗原；DNP、TNPまたはBPO等のハプテン基を、蛋白、多糖体または細胞等のキャリアーに結合させた人工抗原等がある。本発明によりポリクローナル抗体を高精度で分離精製しようとする場合、抗原(A)で動物を免疫する際に不純物として混入する抗原(B)の割合を少なくすることが好ましい。

【0009】本発明において使用するカラムの担体はヒドロキシアパタイトであり、通液性が優れることから、好ましい担体は六角柱状または針状ヒドロキシアパタイトからなる凝集体であり、より好ましくは細孔容積が1~5ml/g、更に好ましくは細孔容積が1.5~3ml/gの六角柱状または針状ヒドロキシアパタイトからなる凝集体である。細孔容積が1~5ml/gの六角柱状または針状ヒドロキシアパタイトからなる凝集体を使用すると、カラムの目詰まりを起こし難く、工業的規模で大量のポリクローナル抗体を分離するのに好適であり、被分離液が分離・精製し難いタンパク質等の高分子物質を含有する場合でも、常圧下で十分な高流速が得られ、長時間の処理も可能である。ここで細孔容積とは、ヒドロキシアパタイト凝集体に含まれる細孔の全容積のことをいい、水銀接触角を130°とし、表面張力を484dyn/cmとする条件下で、水銀圧入法により、測定される値である。細孔容積が1ml/g未満では、十分な流速が得られ難いほか、目詰まりを起こし易く、X抗体の吸着量も十分ではない恐れがあり、他方、細孔容積が5ml/gを超えると、

凝集体の強度が長時間使用するには充分ではない恐れがある。

【0010】また、本発明におけるヒドロキシアパタイトとして、六角柱状または針状ヒドロキシアパタイトの凝集体を使用する場合、好ましい平均粒径は、60~100μmであり、ヒドロキシアパタイト凝集体のうち、粒径10μm未満の微小凝集体の割合が1vol%以下であることが好ましい。粒径10μm未満の微小凝集体の割合が1vol%を超えると、これらの微小凝集体が細孔に入り込み、目詰まりを起こし易く、分離性能が低下する原因となり、さらに、カラムにヒドロキシアパタイト凝集体を充填する際、上澄みに存在する微粒子をデカンテーションで除去する必要性が生じることがある。

【0011】六角柱状または針状ヒドロキシアパタイトは、例えばモネタイトの六角柱状または針状結晶を合成し、しかる後にアルカリ添加によりヒドロキシル化して製造することが出来るが、1~5ml/gの好ましい細孔容積を持つヒドロキシアパタイト凝集体とするには、六角柱状または針状のモネタイト結晶を加熱下アルカリ処理する際に、使用するアルカリとしてKOHまたはLiOHを選択することが好ましい。

【0012】本発明の分離精製方法では、カラムの充填率を10%以下にすることが好ましく、より好ましくはカラムの充填率を2~8%、更により好ましくは3~5%にする。充填率が10%を超えると、常圧下で十分な流速が得られ難い恐れがある。ここで、充填率(P)は下式で算出される値である。

$$P = \frac{\text{ヒドロキシアパタイト充填量(g)} \times 100}{\text{カラム容積(ml)}} \times 100$$

$$P = \frac{\text{単位充填体積(cm}^3\text{)} \times \text{ヒドロキシアパタイト真密度(g/cm}^3\text{)}}{\text{カラム容積(ml)}} \times 100$$

【0013】充填率は、ヒドロキシアパタイト凝集体の粒度分布および細孔容積等により容易に制御することができる。このように低い充填率を有するカラムを調製するには、前記のヒドロキシアパタイト凝集体を溶媒中に分散させ、適当な濃度のスラリー状になったものをカラムに充填すればよい。ヒドロキシアパタイトを分散させる好ましい溶媒としては、カラムクロマトグラフィーを行う際に用いる溶液、例えば、1~10mM磷酸緩衝液がある。

【0014】本発明の分離方法は、カラムクロマトグラフィー法によりポリクローナル抗体を分離精製するものであり、具体的には例えば以下の操作により実施することができる。即ち、担体をカラムに詰め、ポリクローナル抗体をカラムに注入することにより、担体にポリクローナル抗体を吸着させる。その後、適当な移動相液を供給することにより、担体に吸着させたポリクローナル抗体を、担体への分配の小さいものから順次溶出させる。分配が大きいポリクローナル抗体を分離する場合は、移動相液の組成を変化させて固定相への分配を小さくして

溶出させることが好ましい。本発明の分離方法は、常圧下で充分に実施することができるが、必要に応じて加圧下で実施することもできる。

【0015】その他の分離操作については、一般的なカラムクロマトグラフィー法の操作に従えば良いが、好ましい条件としては、例えば以下のものがある。流速：一般にカラムの大きさにより違うが、分析用の細いカラムでは0.5~1ml/min、分取用の比較的太いカラムでは3~5ml/minが適当であり、例えば内径12.5mm、長さ40cmのガラス製オープンカラムでは、2~3ml/minが適当である。

移動相液の通液量：カラムに充填したヒドロキシアパタイト凝集体の約10倍の体積量。

移動相液の組成：磷酸緩衝液、より好ましくは磷酸カリウム緩衝液。

溶出条件：1~10mMから300mMまでの磷酸緩衝液を、低濃度から高濃度へ濃度を段階的に変化させて溶出させることが好ましく、具体的にはタンパク質の溶出が急激に増加し始めるときから、タンパク質の溶出濃度が

極大となった後、その極大値より充分に低くなるまで、磷酸緩衝液の濃度を一定にすることが好ましい。このように磷酸緩衝液の濃度を段階的に変化させて溶出させると、ポリクローナル抗体から抗原特異抗体をより高精度で分離精製することができる。

カラム温度：室温。ポリクローナル抗体の変質を防止するため、より好ましくは4℃。

ポリクローナル抗体の負荷量：最大吸着量の約10分の1。

#### 【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

【ヒドロキシアパタイト】まず、針状ヒドロキシアパタイト凝集体を以下のようにして合成した。即ち、攪拌機および冷却管を取りつけた3Lフラスコに純水1Lを仕込み、95℃に加熱した後、0.5モル/Lの塩化カルシウム水溶液と0.5モル/Lのリン酸2ナトリウム水溶液各1Lを5時間かけて滴下し、針状結晶のモノタイトからなる凝集体を得た。引き続き同温度で、1モル/Lの水酸化カリウム水溶液300mlを1時間かけて滴下し、針状ヒドロキシアパタイト凝集体を得た。

【0017】上記のようにして得た針状ヒドロキシアパタイト凝集体について、以下のようにして細孔容積、粒度分布および通液性に関する評価を行った。

（細孔容積）水銀接触角を130°とし、表面張力を48.4dyn/cmとする条件下で、水銀圧入法により、ヒドロキシアパタイト凝集体の細孔容積を測定した。

（粒度分布）細粉製作所製レーザー回折式粒度分布測定装置LA-500を用いて、粒度分布を測定し、平均粒径を求めた。

（通液性試験）内径12.5mm、長さ40cmのガラス製オープンカラムにベッドポリウム15mlとなるようにヒドロキシアパタイト凝集体を充填し、さらに10mM磷酸緩衝液（pH6.8）を加えて全量が30mlとなるよう調整した。前記緩衝液を常圧下で通液し、単位時間当りの流出量（ml/hr）を測定した。細孔容積、平均粒径、通液性試験および充填率の結果を以下に記す。

細孔容積：1.8ml/g

平均粒径：89μm（10μm以下の割合：0.3%）

充填率：4.8%

通液性：240ml/hr

【0018】【ポリクローナル抗体】下記2種の抗ヒト血清アルブミン（以下HSAと称す）抗体（ウサギ血清の1gG分画）を使用した。

試料①：フナコシ株式会社製（カタログ番号：NE-0621-40）

試料②：医学生物学研究所製（カタログ番号：127）アフィニティクロマトグラフィーにより上記2種の試料を分離した結果、試料①の場合、図1のクロマトグラムが得られ、試料②の場合、図2のクロマトグラムが得ら

れた。このときのゲルの調製方法および溶出条件は以下の通りである。

#### ○ゲルの調製

(1) 20mlのセファロース（Sephacrose）4Bゲル【ファルマシア株式会社製商品名】を水で洗浄後、これに30mlの水を加える。このゲルに、予め20mlの水に2gのシアニ化臭素を溶かした水溶液を添加し、その後2NのNaOH水溶液を適量添加し、pH値を10.5～11に保ちつつ、8分間放置した。

(2) 上記(1)で処理したゲルを、1Lの冷0.1M炭酸緩衝液（pH9.0）で洗浄後、HSA溶液（HSA20mg/炭酸緩衝液10ml）を加え、4℃で一晩放置した。

(3) 上記(2)で処理したゲルに10gのトリスペスを加え、37℃で1時間放置後、リン酸緩衝液でpH値が7.4になるまで充分洗浄することにより、アフィニティクロマトグラフィーに使用するゲルを調製した。

#### ○溶出条件

上記のようにして得た10mlのゲルを充填したカラムに、試料を負荷させた後（試料①の場合200μL、試料②の場合50μL）、まずリン酸緩衝液で未吸着物質を溶出させ、その後0.17Mのグリシン-塩酸溶液（pH2.5）で吸着物質を溶出させた。図1及び図2において、グリシン-塩酸溶液の通液により抗ヒト血清アルブミン抗体が溶出する前に、アルブミンに特異的に反応しない抗体（抗原非特異抗体）が、未吸着物質として溶出することから、試料①および試料②には抗原非特異抗体が含有されていることがわかる。なお、ウサギの1gGはサブクラスがないことが知られており、またアタッシイらの報告によれば、HSAには7つの抗原決定基がある【ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、145巻、1～20頁（1984年）】。

【0019】【カラムの調製】内径10mm、長さ15cmのガラス製カラムに、1mM磷酸緩衝液に分散したヒドロキシアパタイト凝集体を充填し、ベッドポリウムを10ccとした。予め1mM磷酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した後、2mgの試料を負荷した。

【溶出条件】1mM磷酸緩衝液（A液とする）と300mM磷酸緩衝液（B液とする）を予備混合して適当な濃度に調整した混合液をカラムに通液することにより溶出を行った。混合液の濃度は、B液の混合割合を8%から100%まで変化させ、段階的に上げた。なお、通液時におけるカラムのpH値は7.5である。

【抗体活性の測定】溶出液を5ml/tubeづつフラクションコレクターで回収した。各フラクションについて抗体活性を酵素免疫測定法（EIA法）【イングバルら、イムノケミストリー、8巻、871ページ（1971年）】によって測定した。

【0020】【試料①に関する結果】図3に試料①のクロマトグラムを示す。この図における実線は、波長28

0nmにおける溶出液の吸光度であり、これはタンパク質濃度を示す指標であり、点線は、B液の混合割合(%)であり、カラムに通液したリン酸緩衝液の濃度を表し、段階的にリン酸緩衝液の濃度を上げたことを示す。図4は、抗原としてHSAとウシ血清アルブミン(以下BSAと称す。)を用いるEIA法を実施し、波長490nmにおける溶出液の吸光度を測定した結果により抗体活性の大小を示したものである。この図から、HSAに特異的に反応する抗体は実線で示した4本のピークとして認められ、抗原特異抗体を分離することができる。特に、これら4本のピークのうちフラクションNo. 20以上のピークは、図3におけるタンパク質吸光度が低いにも関わらず、かなり高い抗体活性を示しているから、フラクションNo. 20以上で回収された溶出液中には、かなり高純度の抗原特異抗体が含有されている。以上のように、本発明により、抗原特異抗体をpH値7.5という穏和な条件下で簡便に分離することができる。【0021】更に、この分離例においては、アフィニティクロマトグラフィーで分離精製すると1分画としてしか得られない抗原特異抗体が4分画に分けられることがわかる。このように抗原特異抗体を4分画に分けられる理由については、本発明者らは抗体の抗原決定基の相違によるものではないかと推定している。HSAには7個の抗原決定基が存在することが指摘されているにも関わらず、この分離例において4分画にしかわかれなかったのは、互いに接近したピークが重なったためであると考えている。又、互いに類似した抗原であるHSAとBSAに特異的に反応する抗体の活性度を、それぞれ実線と点線で示したが、実線と点線のピークはほぼ同じフラクションで現れており、実線のピークと点線のピークとの抗体活性度の比がピーク毎に異なっているのは、抗原決定

基の構造の類似性及び個々の相違を反映しているものと考えている。

【0022】【試料②に関する結果】図5に試料②のクロマトグラムを示す。この図における実線および点線が表す内容は図3と同じである。図6は図4と同様に抗体活性の結果を示す。図5と図6から、フラクションNo. 25以上で回収された溶出液中には、かなり高純度の抗原特異抗体が含有されており、本発明により、抗原特異抗体をpH値7.5という穏和な条件下で簡便に分離することができる。【発明の効果】本発明の分離精製方法によれば、従来のアフィニティクロマトグラフィー法よりも穏和な条件下、しかも簡便かつ安価で抗原特異抗体を得ることが出来る。又、アフィニティクロマトグラフィーで分離精製すると1分画としてしか得られない抗原特異抗体を、本発明においては適当な溶出条件を選択すれば、複数の分画に分けることが出来る。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】アフィニティクロマトグラフィーによりフナコシ株式会社製HSA抗体(カタログ番号: NE-0621-40)を分離したときのクロマトグラムである。

【図2】アフィニティクロマトグラフィーにより医学部生物研究所製HSA抗体(カタログ番号: 127)を分離したときのクロマトグラムである。

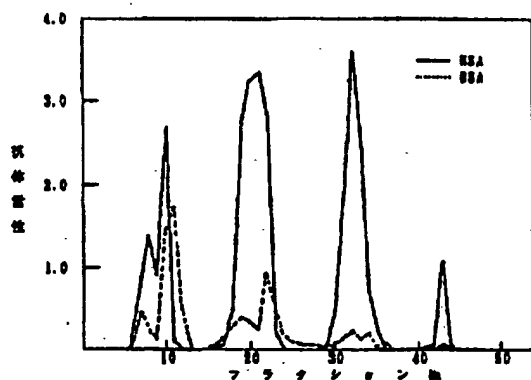
【図3】本発明の方法によりフナコシ株式会社製HSA抗体を分離したときのクロマトグラムである。

【図4】本発明の方法によりフナコシ株式会社製HSA抗体を分離したときの抗体活性チャートである。

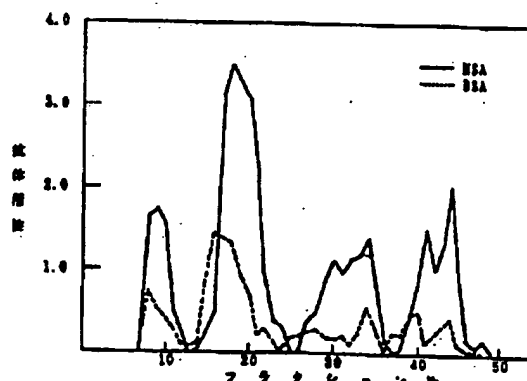
【図5】本発明の方法により医学部生物研究所製HSA抗体を分離したときのクロマトグラムである。

【図6】本発明の方法により医学部生物研究所製HSA抗体を分離したときの抗体活性チャートである。

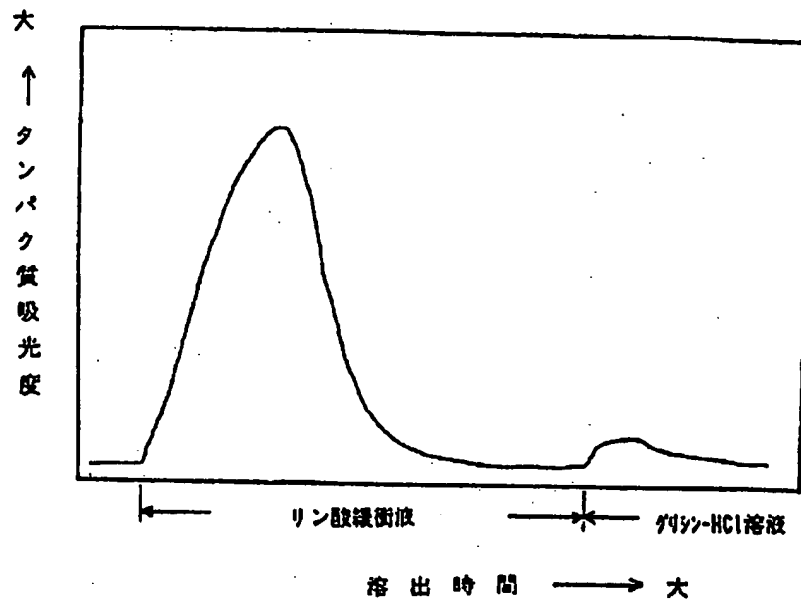
【図4】



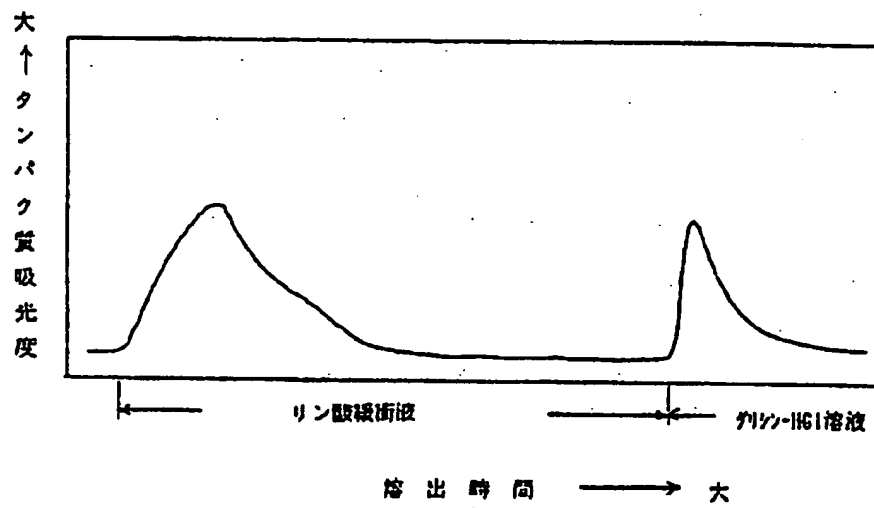
【図6】



【図1】

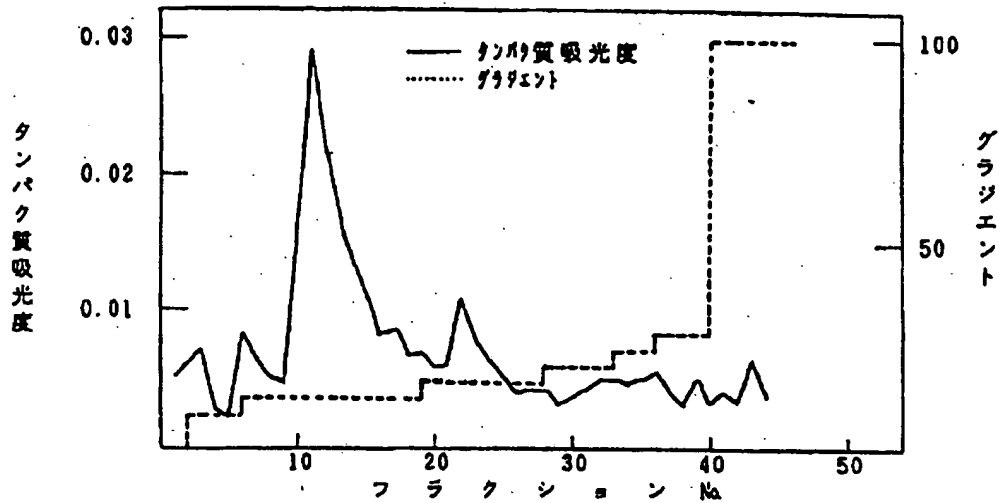


【図2】

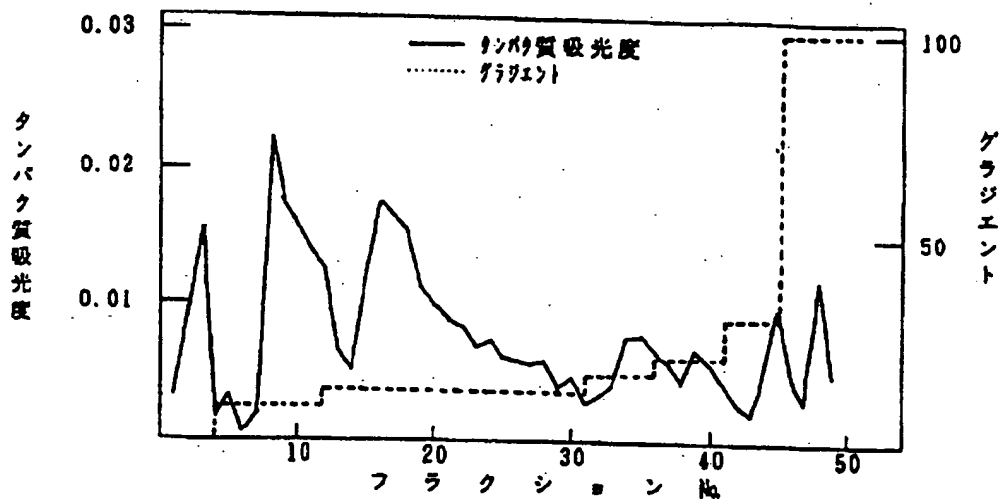




【図3】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 高木 修

愛知県名古屋港区船見町1番地の1 東亜  
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

(72)発明者 加藤 秀樹

愛知県名古屋港区船見町1番地の1 東亜  
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内